

A trehalóz, mint amorfizálódásra hajlamos segédanyag, rekrisztallizációjának vizsgálata

KATONA GÁBOR, JÓJÁRTNÉ LACZKOVICH ORSOLYA ÉS SZABÓNÉ RÉVÉSZ PIROSKA*

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertechnológiai Intézet, Szeged, Eötvös u. 6. – 6720

*Kapcsolattartó email címe: revesz@pharm.u-szeged.hu

Summary

Katona, G., Jójárt-Laczovich, O., Szabó-Révész, P.*: *Investigation of the recrystallization of trehalose as a good glass-former excipient*

An amorphous form of trehalose is easy to prepare by using a solvent method. The recrystallization kinetics can be followed well, which is important because of the occurrence of polymorphic forms of trehalose. This is especially significant in the case of dry powder inhalers. Spray-drying was used as a preparation method this being one of the most efficient technologies with which to obtain an amorphous form. This method can result in the required particle size and a monodisperse distribution with excellent flowability and with moreover considerable amorphization. In our work, trehalose was applied as a technological auxiliary agent, and literature data relating to the spray-drying technology of trehalose were collected. Studies were made of the influence of the spraying process on the amorphization of trehalose and on the recrystallization of amorphous trehalose during storage. Amorphous samples were investigated under 3 different conditions during 3 months. The recrystallization process was followed by differential scanning calorimetry and X-ray powder diffraction. The results demonstrated the perfect amorphization of trehalose during the spray-drying process. The glass transition temperature was well measurable in the samples and proved to be the same as the literature data. Recrystallization under normal conditions was very slow but at high relative humidity the process was accelerated greatly. Amorphous trehalose gave rise to dihydrate forms (γ - and h -trehaloses) during recrystallization, and β -trehalose was also identified as an anhydrous form.

Keywords: trehalose, amorphous form, spray-drying, recrystallization, polymorphism.

Összefoglalás

A trehalóz oldószeres eljárással könnyen amorfizálható anyag. A rekrisztallizáció folyamata jól nyomon követhető, vizsgálata pedig indokolt a spontán amorfizálódás következtében megjelenő különböző polimorf módosulatok miatt. Ennek különösen a porinhalációs készítményeknél van jelentősége. Oldószeres eljárásként a porlasztva szárítást alkalmaztuk, amivel kívánt szemcseméretű, kiváló folyási tulajdonsággal rendelkező monodiszperz rendszer állítható elő, valamint nagymértékű amorfizálódás következhet be. A kísérletes munka előzményeként bemutatjuk a trehalózt, mint a gyógyászatban alkalmazott segédanyagot és annak legfontosabb tulajdonságait, illetve porlasztva szárítással történő feldolgozásának irodalmi hátterét. Arra kerestük a választ, hogy porlasztva szárítással előállítható-e amorf trehalóz, s különböző körülmények között tárolva (3 hónap), milyen változásokat tapasztalunk. Analitikai módszerként a differenciális pásztázó kalorimetriát és a porröntgen diffrakciós módszert alkalmaztuk. Megállapítottuk, hogy a porlasztva szárítás nagymértékű amorfizálódást okoz a mintákban. Az üvegesedési hőmérséklet mérhető és az irodalmi értékkel megegyező tartományba esik. Továbbá megállapításra került, hogy magas páratartalmú közegben a trehalóz túlnyomórészt dihidrát formában (γ - és h -trehalóz) kristályosodik vissza, és a rekrisztallizáció üteme lényegesen felgyorsul. A rekrisztallizáció során egyéb polimorf módosulatot is azonosítottunk (anhidrát β -trehalóz).

Kulcsszavak: trehalóz, amorf forma, porlasztva szárítás, rekrisztallizáció, polimorfia

Bevezetés

A gyógyszerformák tervezésénél a hatóanyagok mellett a segédanyagok is kulcsfontosságú szerepet töltenek be. A helyes segédanyag megválasztásával jobb oldódási profil, nagyobb stabilitás, módosított hatóanyag leadás és jobb préselhetőség érhető el [1]. Az iparban általában kristályos formában dolgozzák fel a ható- és segédanyagokat a formulálás során, azonban egyes esetekben kedve-

zőbb tulajdonságok érhetőek el az amorf forma alkalmazásával. Ezen tulajdonságok közé tartozik a jobb vízzoldékonyság, jobb préselhetőség, ismételt szabadalmaztathatóság és a polimorf módosulatok egymásba alakulásának megakadályozása [2].

A száraz porinhalációs készítményeket (Dry Powder Inhaler – DPI) leggyakrabban porlasztva- vagy fagyasztva szárítással állítják elő. Ezekkel az eljárásokkal kívánt szemcseméretű, valamint kívá-

ló folyási tulajdonsággal rendelkező monodiszperz rendszer állítható elő, viszont nagymértékű amorfizálódást is eredményezhet. A folyamatot, amikor az anyag valamely gyártásközi művelet, esetleg a tárolás során részben vagy egészben amorfizálódik, „indirekt amorfizálásnak”, vagy amorfizálódásnak nevezzük. A kristályos és az amorf forma aránya a porinhalációs készítmények alkalmazhatóságát jelentősen befolyásolja, így folyamatos kontrollálást igényel mind a gyártás, mind pedig a felhasználásig történő tárolás során.

A kísérletes munka modell segédanyaga

A kísérletes munka modell anyagának a trehalózt választottuk, mint amorfizálódásra hajlamos segédanyagot, mivel a feldolgozás során könnyen amorfizálódhat. A trehalóz α -D-glükopiranozil- α -D-glükopiranozid-dihidrát (α , α -trehalóz-dihidrát) vagy mikóz, ami egy természetes alfa-kötésű diszacharid, amelyet két α -glükózegység alkot α 1 \rightarrow 1 glikozidos kötéssel (1. ábra). Fehér, vagy csaknem fehér kristályos por, amely vízben bőségesen, metanolban alig és etanolban gyakorlatilag nem oldódik.

A trehalóz a természetben is előforduló anyag. Gombák (ebből adódik egyik szinoním neve, a mikóz = „gomba cukor”), növények és gerinctelen állatok is bioszintetizálják. Széles körben alkalmazzák segédanyagként az ipar több területén is, mint például a kozmetikai-, mezőgazdasági-, élelmiszer- és a gyógyszeriparban. Az iparban a keményítő enzimatiszálásával állítják elő. Más diszacharidoktól eltérően, az előállítás folyamán nem lép kémiai reakcióba aminosavakkal vagy fehérjékkel, és ez megakadályozza a termék barnulását (Maillard reakció). A trehalóz egy nem reaktív cukor. Erős stabilitása a két glükopiranoz gyűrűt összekötő glikozidos kötés kis energiájának (1 kcal/mol) köszönhető. Nem disszociál két

redukáló monoszacharid alkotórészre, csak extrém hidrolitikus körülmények között vagy trehaláz enzim hatására (amelyet a gombák és az emberi szervezet is szintetizál).

Szerepet játszik a növények és állatok anhidrobiózisában, vagyis abban a tulajdonságukban, hogy hosszú ideig képesek életben maradni víz nél-

kül. Nagy víztartó képességét a kozmetikai- és élelmiszeriparban is hasznosítják.

A biomolekula stabilizációjának mechanizmusát először Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FT-IR) alkalmazásával vizsgálták a fehérjék és cukrok közötti kölcsönhatások jellemzésének céljából. Ezt követően infravörös (IR) és Raman-spektroszkópia segítségével kimutatták, hogy a trehalóz legjelentősebb funkciója, hogy koncentrálna azt a kis mennyiségű vizet a fehérje közelében, amely a funkció megtartásához szükséges. A trehalóz fehérjestabilizáló képességét az ipar számos területén hasznosíthatják; például a kozmetikai iparban hidratáló készítményekben, vagy a gyógyszeriparban liposzóma stabilizálására.

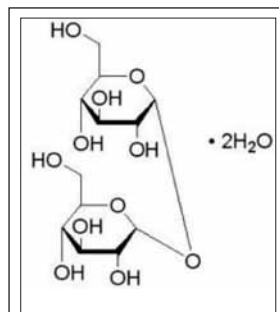
Az élelmiszeriparban szintén alkalmazott segédanyag. Itt édesítő- és stabilizáló szerként egyaránt használják. Édessége a szacharóz 45%-ával egyezik meg.

A gyógyszeriparban hatóanyagként is felhasználásra kerül. „Chaperone” elnevezésű anyagként használják, amely segítséget nyújt a Creutzfeld-Jacob kórt, cisztás fibrózist és amiloid rendellenességeket okozó fehérje aggregációjának megelőzésében.

A trehalóz segédanyagként való legfontosabb alkalmazási területei gyógyszerészeti szempontból az oltóanyagok stabilizálása szobahőmérsékleten való tárolás céljára, enzimek tartósítása, illetve emlős sejtek liofilizálás alatti károsodástól való védelme. Mivel koncentrálna a fehérje közelében a vizet, így az a liofilizálás után vissza tud rendeződni natív szerkezetébe és visszanyeri funkcióját. Fejlődő országokban a járványos gyermekbénulás ellen alkalmazott orális oltóanyagok előállításánál azt tapasztalták, hogy trehalóz jelenlétében 45 °C-on szárítva azok stabilak maradtak, összehasonlítva a 4 °C-on lefagyasztott folyékony oldattal [3]. A trehalóz másik fontos alkalmazási területe a DPI formában történő hordozóanyagként való felhasználása [4-6].

A trehalóz is, mint nagyon sok más a gyógyszeriparban alkalmazott ható- és segédanyag, polimorfiára hajlamos. A segédanyagok polimorfiájának nagy jelentősége van a gyógyszeriparban, hiszen ez alapvetően meghatározza az adott forma olvadáspontját, oldékonyságát, fizikai és kémiai stabilitását. A trehalóznak 4 polimorf módosulata ismeretes, amelyek különböző olvadásponttal rendelkeznek (I. táblázat) [7].

A fent említett példák azt támasztják alá, hogy a trehalóz, mint gyógyszeripari segédanyag, számtalanszor kerül feldolgozásra porlasztva [4, 8-10] és fagyasztvaszáritással [11-13]. Mivel ezek



1. ábra: Trehalóz (D(+)-trehalóz-dihidrát) szerkezeti képlete

I. táblázat

A trehalóz polimorf módosulatainak olvadáspontja [7]

Polimorf módosulat neve	Olvadáspont (°C)
α -trehalóz	126
β -trehalóz	215
γ -trehalóz	118-122
h-trehalóz	100-110

az eljárások gyakran okoznak amorfizálódást, ezért a segédanyag ilyen szempontból történő vizsgálata igen érdekes lehet. Forgalomban lévő liofilezéssel formulált védjegyzett készítmény például az ADVATE[®], amelyben a hatóanyagot, a rekombináns VIII-as véralvadási faktort, a trehalóz stabilizálja [14]. Továbbá a 4 polimorf módosulat létezése a rekrisztallizáció követését is indokolja.

Az amorfizálás technológiai megvalósítása

Az amorf anyagok kialakulására / kialakítására három technológia alkalmazható: *olvadék technológia, őrléses és oldószeres eljárások* [15]. Olvadék technológiával két úton lehet amorf anyagot előállítani. Az egyik művelet során a kristályos anyagot megolvastjuk, majd ezt az olvadékot hirtelen dermesztjük. A másik művelet során a kristályos anyagot a segédanyag olvadékában diszpergáljuk, majd ezt az olvadékot szintén dermesztjük [16]. Dezintegráló műveletek közül őrléssel is előállíthatunk amorf anyagot. Őrlés során olyan mértékű mechanikai erőt fejtünk ki a kristályrácsra, amekkorát az az elasztikus határok közt nem képes tolerálni, így megváltozik a szerkezete. A keletkező hő hatására a lokális olvadások miatt is amorfizálódhat az anyag [17]. Az oldószeres eljárások között három csoportot különíthetünk el: hőmérsékletemeléssel történő dehidráció, nyomáscsökkenéssel történő szárítás (liofilezés) [18], porlasztásos technológia [19]. Jelen munka az oldószeres megoldások témakörét, azon belül is a porlasztva szárítást érinti.

Porinhalációs készítmények formuláláshoz alkalmazott segédanyagok gyógyszertechnológiai vonatkozásai

A porlasztva szárítás egyik jelentős felhasználási területe a por inhalációs készítmények előállítása. A porinhalációs rendszerek pulmonális gyógyszerbevitelre alkalmas szilárd fázisú készítmények. Fő előnyük, hogy nagy koncentrációjú hatóanyagot juttathatunk célzottan a tüdőbe és minimális az extrapulmonális veszteség. Kiválthatunk

vele helyi illetve szisztémás hatást, valamint kedvező a biológiai hasznosíthatósága. Ennek a gyógyszerformának a fejlesztése, relatíve kevés segédanyaggal megoldható, a hatóanyag stabilitásának biztosítása egyszerű. Nincs hajtógáz, csupán egy adagolócsavar, melynek kattanásig történő tekerésével a „unit dose” adagolás biztosított, így nem kell tartani a túladagolástól sem [20]. A szemcseméretnek 1-5 μm -es mérettartományba kell esnie, mivel az ennél nagyobb szemcsék nem jutnak át a légutakon az alkalmazás helyére, az ennél kisebbek pedig a kilégzéssel távoznak. Ahhoz viszont, hogy a por jó folyási tulajdonságokkal rendelkezzen, ne legyen kohezív és jól lehessen dózrozni, segédanyagokra van szükség. Ezeket az anyagokat, amelyek a hatóanyagot célba juttatják, hordozóanyagnak hívjuk. Erre általában α -laktózmohidrátot alkalmaznak, de az új készítményekben már más segédanyagokkal is helyettesíthetik a laktózt. Ennek egyik oka a TSE (átadható spongiform enkefalopátiás betegségek) elkerülése, a másik pedig, hogy a laktóz reakcióba léphet az amino csoporttal, így fehérje és peptid készítmény nem formulálható vele. Ebben az esetben a laktózt többek között trehalózzal helyettesítik. Lehetőség van még a raffinóz és a szukróz alkalmazására is. Ezeknek a nem redukáló cukroknak van egy olyan közös kedvező tulajdonsága, hogy porlasztva szárítás során megvédi a fehérjét vagy peptideket a különböző stresszhatásokkal szemben. Helyettesítik a hidrogén kötések, amelyeket normál esetben a víz tesz, valamint viszkozus keveréket alkotnak a fehérjével, melynek következményeként magas üvegesedési hőmérsékletű termék keletkezik [21].

Kísérletes munka

A kísérletes munkánk arra világít rá, hogy a polimorfira hajlamos amorfizált vagy amorfizálódott segédanyagok a hőmérséklet és a relatív páratartalom viszonyának változására különböző polimorf módosulatok formájában kristályosodhatnak vissza és ennek nagy jelentősége van a feldolgozás, valamint az alkalmazás során. Mivel a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszertechnológiai Intézetében már van tudományos előzménye az anyagok amorfizálhatóságának [15, 22-26], így azt a célt tűztük ki magunk elé, hogy a porinhalációs készítmények egyik fontos komponensének a trehalóznak, az amorfizálódását és az amorf forma tárolás során bekövetkezett rekrisztallizációját, polimorf módosulatait tanulmányozzuk.

Kiindulási segédanyag

A kiindulási anyag a D(+)-trehalóz-dihidrát volt (Carl. Roth. GmbH + Co. KG. 76185 Karlsruhe). Ezt tekintettük 100%-os kristályos anyagnak. Víz-tartalma $9,5 \pm 0,5\%$, szulfáttartalma pedig kevesebb, mint $0,5\%$ volt. Fajlagos forgatóképessége: $178 \pm 2^\circ$.

Minták előállítása

A kísérletes munkánk során két mintát állítottunk elő, azonos körülmények között. Mindkét esetben a trehalózból tisztított vízzel 10%-os oldatot készítettünk mágneses keverő segítségével, és ezt az oldatot BÜCHI B-191 Mini Spray Dryer (Büchi, Svájc) készülékkel porlasztottuk a **II. táblázatban** megadott paraméterek mellett [10]. Az így nyert terméket szobahőmérsékleten ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) exsikkátorban tároltuk $32 \pm 5\%$ -os relatív páratartalmú (RH) légterben a vizsgálatok indításáig.

Tárolási körülmények

A mintákat 3 hónapig tároltuk, különböző körülmények (hőmérséklet, relatív páratartalom-RH) befolyását vizsgálva [27]. Az első porlasztott mintát (**I**) normál körülmények közt tároltuk, míg a másodikat (**II**) két részre osztottuk, egyik felét a gyorsított stabilitási vizsgálatoknak (**IIa**), másik felét pedig ennél intenzívebb terhelésnek (**IIb**) vetettük alá, a következők szerint:

- normál körülmények között (**I**), exsikkátorban, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ és $32 \pm 5\%$ RH,
- a gyorsított stabilitási vizsgálat körülményei között (**IIa**), $40 \pm 2^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ RH [26],
- intenzíven terhelt kondíciók között (**IIb**), $60 \pm 2^\circ\text{C}$, $90 \pm 5\%$.

Utóbbi kettőnél mi állítottunk elő különböző koncentrációjú kénsav tartalmú higrosztát tölteteket és termosztátba helyeztük azokat. A tárolási körülményeket folyamatosan kontrolláltuk.

II. táblázat

Porlasztási paraméterek

Paraméterek	Beállítás
Bemenő hőmérséklet ($^\circ\text{C}$)	130-140
Kimenő hőmérséklet ($^\circ\text{C}$)	75-92
Pumpaáramlás (ml/min)	2
Sűrített levegő nyomása (bar)	4,8
Atomiser pumpaáramlás (normoliter/h)	600
Aspirátor (%)	80
Pumpa áramlása (%)	2

Vizsgáló módszerek

A mintákat METTLER Toledo 821^e DSC (Mettler-Toledo GmbH., Gießen, Németország) segítségével vizsgáltuk. Ennek a módszernek a segítségével igazoltuk a trehalóz amorf formájának létét és az amorf forma üvegesedési hőmérsékletét (T_g) is követni tudtuk a rekrisztallizációs folyamat során. A mérés során $5 \pm 0,2$ mg mintát mértünk alumínium tégelybe analitikai mérleg segítségével, majd a tégelyt lezártuk és behelyeztük a kemencébe. A kemencét 25°C -tól 250°C -ig fűtöttük fel $10^\circ\text{C}/\text{min}$ fűtési sebességgel és mértük a mintában lejátszódó termikus változásokat. Az eredményeket STAR^e szoftver segítségével értékeltük ki.

A visszakristályosodás folyamatának meghatározásához porröntgen diffrakciós vizsgálatokat is végeztünk. Erre Bruker D8 Advance diffraktométerrel (Bruker AXS GmbH., Karlsruhe, Németország) berendezést használtunk. Sugárforrásként Cu K α 1 sugárzást ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) alkalmaztunk. A minták vizsgálata 40 kV feszültség és 40 mA áramerősség alkalmazása mellett 3° -tól 40° -ig (2θ) történt. A szkennelési sebesség $0,1^\circ/\text{min}$, a lépésköz pedig $0,010^\circ$ volt. A műszer kalibrálása korund segítségével történt. Az eredmények kiértékelésére pedig DIFFRACTplus EVA szoftvert alkalmaztunk. A diffraktogramokat K α 2-vel korrigáltuk, simítottuk és az alapvonal korrekcióját is elvégeztük. A termékek azonosítására a Cambridge-i Krisztallográfiai Adatbázist (CCDC ID: AI631510) használtuk.

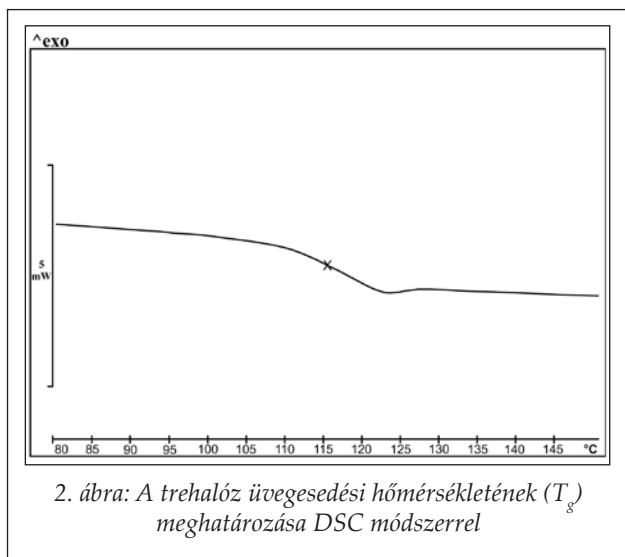
Differenciális pásztázó kalorimetriás vizsgálatok (DSC)

A trehalóz T_g -je kísérletes úton, DSC vizsgálattal meghatározható. A mintát felfűtöttük olvadáspontja fölé, majd visszahűtöttük szobahőmérsékletre és megismételtük a fűtést ugyanazzal a fűtési sebességgel. A következőket tapasztaltuk:

- a második melegítés során eltűnt a karakterisztikus olvadáspont,
- a fűtési folyamat során nem érzékelünk bomlásra utaló jelet,
- a T_g láthatóvá vált a görbén (2. ábra).

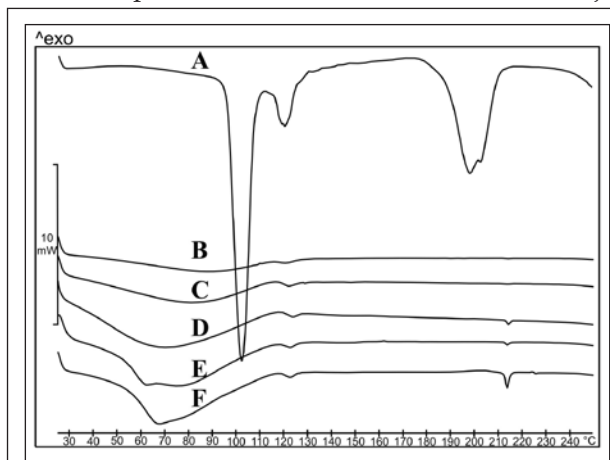
Az átmenet $109,3$ - $130,0^\circ\text{C}$ -ig tart, középértéke $115,4^\circ\text{C}$ -nál található. A trehalóz irodalomból ismert T_g -je szintén ebben a tartományban található [7].

Irodalomból ismeretes, hogy az üvegesedési hőmérséklet és az olvadáspont hányadosa előrejeletheti az anyag amorfizálhatóságát [25]. A **3. ábrán** látható, hogy a kiindulási trehalóz három poli-



morf keveréke (A görbe). A görbe alatti terület arányos az egyes módosulatok mennyiségével. Legnagyobb arányban a h-trehalóz található meg és ez a legjobban amorfizálható módosulat, T_g/T_m (K/K) értéke 1,03. Szintén jól amorfizálható a legkisebb mennyiségben előforduló γ -trehalóz, T_g/T_m (K/K) értéke 0,98. A legkisebb T_g/T_m (K/K) értékkel a β -trehalóz rendelkezik (0,71), de még ez a polimorf is a jól amorfizálható kategóriába esik. Ezen elővizsgálatok alapján tehát megállapítható, hogy a trehalóz amorf formája állítható elő porlasztva szárítással és igazolást nyert az is, hogy a trehalóz valóban jól amorfizálható segédanyag.

Az első porlasztásból (I) származó minta vizsgálati eredményeit szintén a 3. ábra szemlélteti. Az A görbén a kiindulási kristályos trehalóz látható, három polimorf módosulat különíthető el rajta.

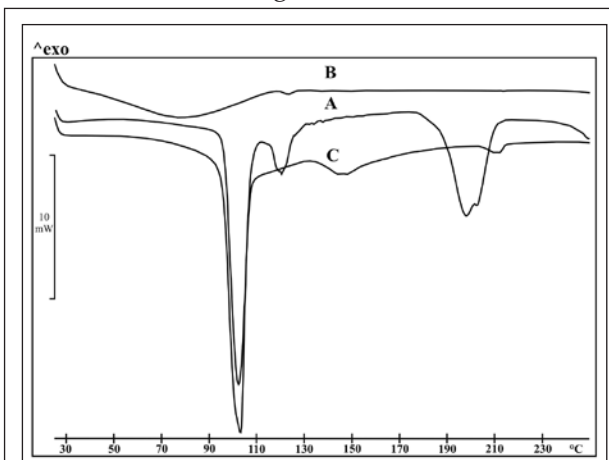


3. ábra: Porlasztva szárított trehalóz rekristallizációjának DSC vizsgálata (I minta, tárolási körülmények: $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $32 \pm 5\%$ RH). A: kiindulási kristályos trehalóz, B: frissen porlasztott minta, C: két napos minta, D: tizennégy napos minta, E: harminc napos minta, F: negyvenkét napos minta.

A három csúcs tehát a különböző polimorf módosulatok olvadáspontja. A többi, B, C, D, E és F görbék pedig a porlasztott minta DSC görbéi időrendi sorrendben. A mintákat normál körülmények között tároltuk ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, $32 \pm 5\%$ RH), és másfél hónapon keresztül vizsgáltuk. A B görbén a frissen porlasztott minta látható. Megállapítható, hogy a porlasztás nem eredményezett 100%-ban amorf terméket, a minta némi kristályos frakciót tartalmazott, mégpedig a γ -trehalóz (dihidrát) polimorf módosulatot, amelynek 122°C -nál van az olvadáspontja. Két nappal később vizsgálva láttuk a C görbén, hogy a kristályos frakció nőtt, azaz megindult egy lassú rekristallizációs folyamat. Tizennégy nappal a porlasztás után azt tapasztaltuk a D görbén, hogy megjelent egy másik polimorf módosulat, a β -trehalóz (anhidrát), melynek 215°C -nál van az olvadáspontja. Harminc (E), majd negyvenkét (F) nappal a porlasztás után azt a következtetést vontuk le, hogy mindkét polimorf módosulathoz tartozó csúcs alatti terület nőtt, azaz nőtt a kristályos frakció mennyisége.

Újabb sarzsot porlasztottunk (II) azonos körülmények között a trehalóz vizes oldatából. Az ezen porlasztásból származó minták vizsgálati eredményeit mutatja a 4. és az 5. ábra.

A 4. ábrán az A görbe a kiindulási kristályos trehalóz DSC görbéje. A B és C görbe pedig a friss és tárolt porlasztott mintáé. Látható, hogy nem eredményezett 100%-ban amorf terméket a második porlasztás sem, a γ -trehalóz (dihidrát) polimorf módosulat megtalálható benne, olvadáspontja 123°C -nál található. A minták egyik felét $40 \pm 2^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ RH higrosztát töltetben tároltuk és



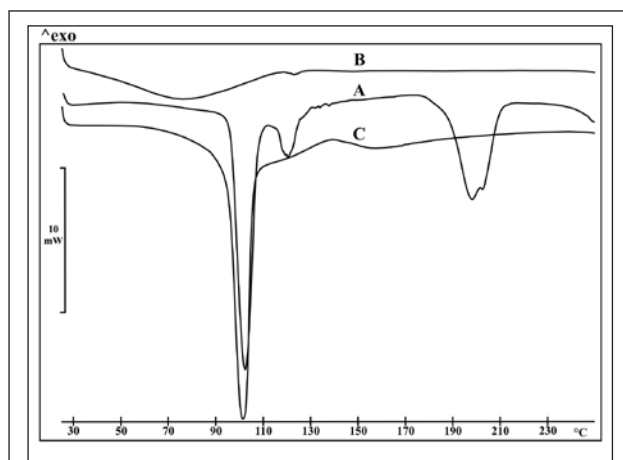
4. ábra: Kiindulási, frissen porlasztott és tárolt minták DSC görbéje: a gyorsított stabilitási vizsgálatok (IIa) körülményeinek ($40 \pm 2^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ RH) hatása az amorf trehalózra. A: kiindulási kristályos trehalóz, B: frissen porlasztott minta, C: tárolt minta 7 nap után.

hét nap után vizsgáltuk. A C görbén látható, hogy egy új polimorf módosulat jelent meg a β -trehalóz (anhidrát), 212 °C-nál. Következtetésként levontuk, hogy a gyorsított stabilitási vizsgálat körülményeinek hatására a minták 100%-ban visszakristályosodtak, mégpedig a h-trehalóz (dihidrát) polimorf módosulatába, melynek olvadáspontja 102 °C-nál található.

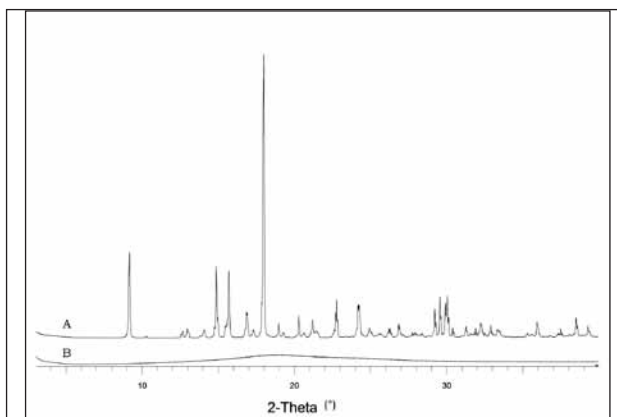
A 5. ábra mutatja a porlasztott minta rekrisztallizációs viselkedését szélsőséges körülmények között. Az A, B, C görbék szintén a kiindulási kristályos trehalóz és a friss és a tárolt porlasztott minták DSC görbéi. A tárolási körülmények ennél a vizsgálatnál a következőképpen alakultak: 60 ± 2 °C-on, $90 \pm 5\%$ RH, tárolási idő: 7 nap. Ugyanazt tapasztaltuk, a kiindulási kevés kristályos frakciót tartalmazó amorf mintánk hét nap elteltével az agresszív tárolási körülmények hatására 100%-ban visszakristályosodott a h-trehalóz (dihidrát) polimorf módosulatába.

A DSC vizsgálatok eredményeit a III. táblázat foglalja össze. Megjelöltük, hogy a vizsgálatok során az irodalomban fellelhető trehalóz polimorf módosulatok közül, melyeket találtuk meg a mintákban. A DSC vizsgálatokból nyerhető adatok alapján, a minták adott polimorfra vetített kristályosságát is kiszámoltuk és jelöltük a táblázatban. Ez az eredmény félkvantitatívnak tekinthető, de a rekrisztallizációs tendencia leírására alkalmas. A vizsgálatok végén tapasztalt 100% fölötti értékek csupán a módszer félkvantitatív jellegére utalnak.

Porröntgen diffrakciós vizsgálatok (XRPD)



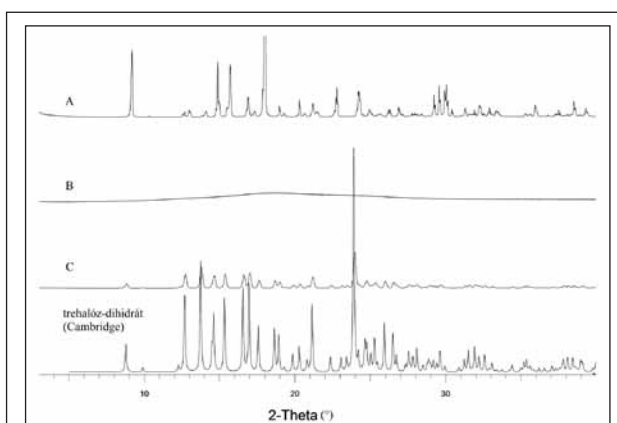
5. ábra: Kiindulási, frissen porlasztott és tárolt minták DSC görbéi: szélsőségesen (IIb) terhelt (60 ± 2 °C, $90 \pm 5\%$ RH) körülmények hatása az amorf trehalózra. A: kiindulási kristályos trehalóz, B: frissen porlasztott minta, C: tárolt minta 7 nap után.



6. ábra: Kiindulási anyag és porlasztva szárított termék porröntgen diffraktogramjai: A: kiindulási kristályos trehalóz, B: frissen porlasztott minta.

A porröntgen diffrakciós vizsgálatok eredményei összhangban vannak a DSC mérésekkel, amelyek a 6. ábrán lévő diffraktogramokon jól követhetők. Az ábra jól mutatja, hogy az A jelzésű kiindulási trehalóz kristályos termék, a B pedig az porlasztva szárítás során képződött I. minta, amely röntgen amorfnak tekinthető.

Az újabb (II. minta) XRPD eredményeit a 7. ábra szemlélteti. Az A diffraktogram a kiindulási kristályos trehalóz, a B a frissen porlasztott amorf minta és a C pedig a tárolt minta diffraktogramja. A B görbe kisimult, a jellemző intenzitás értékek eltűntek, azaz röntgen amorf terméket eredményezett a porlasztás. A visszakristályosodó mintában (C) kezdenek megjelenni a karakterisztikus csúcsok, összehasonlítva a Cambridge-i Krisztallográfiai Adatbázisban lévő trehalóz dihidrát polimorf módosulat diffraktogramjával, látható, hogy



7. ábra: A kiindulási és porlasztással előállított minták porröntgen diffraktogramjai: amorf trehalóz rekrisztallizációja és a visszanyert anyag azonosítása. A: kiindulási kristályos trehalóz, B: frissen porlasztott minta, C: normál körülmények között (25 ± 2 °C és $32 \pm 5\%$ RH) tárolt 1 napos minta.

III. táblázat

Tárolási körülmények hatására megjelenő polimorf módosulatok (3-5. ábra adatai alapján)

Porlasztott minta	Körülmények			Polimorf módosulat			
	Tárolási idő (nap)	Hőmérséklet (°C)	Páratartalom (RH%)	α	β (%)	γ (%)	h (%)
kiindulási trehalóz				-	42,93	6,84	50,23
I	0	25±2	32±5	-	-	4,47	-
I	2			-	-	6,44	-
I	14			-	0,39	5,74	-
I	30			-	0,21	5,92	-
I	42			-	1,62	6,11	-
IIa	0	40±2	75±5	-	-	5,12	-
IIa	7			-	3,29	-	101,9
IIb	0	60±2	90±5	-	-	5,12	-
IIb	7			-	-	-	104,28

a jellemző csúcsok egybeesnek. A porlasztott termék tehát a trehalóz-dihidrát polimorf módosulatba kristályosodik vissza. A kiindulási kristályos trehalósról (A) pedig megállapítható, hogy több polimorf módosulat keveréke, a módosulatok reflexiói megjelennek a diffraktogramon.

Összefoglalás

A kísérletes munka során porlasztva szárítással állítottunk elő trehalóz oldatból amorf szilárd fázisú terméket, majd vizsgáltuk a rekrisztallizáció folyamatát különböző körülményeket alkalmazva a tárolás során. Megállapítottuk, hogy a trehalóz porlasztva szárítással amorfizálódik (kevés kristályos frakció marad a rendszerben). A T_g mérhető a mintákban és megegyezik az irodalmi értékkel. Láthattuk, hogy viszonylag alacsony páratartalom mellett megindul a rekrisztallizáció, de a teljes folyamat igen lassú, időtartama hónapokban mérhető. Intenzívebb körülmények hatására viszont robbanásszerűen megindult a visszakristályosodás. A trehalóznál a dihidrát forma (γ - és h-trehalóz) a meghatározó a rekrisztallizáció során, de anhidrát forma (β -trehalóz) is detektálható. Megfelelően hosszú idő után a kiindulással megegyező polimorf módosulatok keveréke nyerhető vissza. Ez

azt támasztja alá, hogy azoknál a porinhalációs készítményeknél, ahol trehalóz a hordozó, különös figyelmet kell fordítani a megfelelő tárolási körülmények megválasztására.

„A kutatás a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035 Környezeti tényezők és genetikai faktorok interakciójának vizsgálata immunmediált és daganatos betegségek kialakulásába című kiemelt projekt keretében zajlott.”

IRODALOM

- Pifferi, G.; Santoro, P.; Pedrani, M.: *Il Farmaco* 54, 1–14 (1999).
- L. Yu.: *Adv. Drug Deliver. Rev.* 48, 27–42 (2001).
- http://www.omikk.bme.hu/collections/mgi_full-text/bio/2003/06/0602.pdf [2013.06.13.] Molnár, K.: Élelmiszeripari biotechnológiák: A trehalóztermelés új gazdaságosabb eljárásai (2003).
- Ögün, O. N., Li, J., Tajber, L., Corrigan, O. I., Healy, A. M.: *Int. J. Pharm.* 405, 23–35 (2011).
- Islam, N., Gladki, E.: *Int. J. Pharm.* 360, 1–11 (2008).
- Gradon, L., Sosnowski, T. R.: *Adv. Powder Technol.* DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apt.2013.09.012> (2013).
- F. Sussich, A. Cesáro.: *Carbohydr. Res.* 343, 2667–2674 (2008).
- Maurya, M., Murphy, K., Kumar, S., Shib, L., Lee, G.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59, 565–573 (2005).
- Maurya, M., Murphy, K., Kumar, S., Maurer, A., Lee, G.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59, 251–261 (2005).

10. Moran, A., Buckton, G.: *Int. J. Pharm.* 343, 12-17 (2007).
11. Murugappan, S., Patil, H. P., Kanojia, G., ter Veer, W., Meijerhof, T., Frijlink, H. W., Huckriede, A., Hinrichs, W. L. J.: *Eur. J. Pharm. Biopharm* 85, 3, A, 716-725 (2013).
12. Nakamura, T., Sekiyama, E., Takaoka, M., Bentley, A. J., Yokoi, N., Fullwood, N. J., Kinoshita, S.: *Biomaterials* 29, 3729-3737 (2008).
13. Crowe, J. H., Tablin, F., Wolkers, W. F., Gousset, K., Tsvetkova, N. M., Ricker, J.: *Chem. Phys. Lipids* 122, 41-52 (2003).
14. Parti, R., Schoppmann, A., Lee, H., Yang, L.: *Haemophilia* 11, 492-496 (2005).
15. Jójárt-Laczkovich, O., Szabó-Révész, P.: *Drug Dev. Ind. Pharm.*, (2011).
16. Kim, M. S., Jin, S. J., Park, H. J., Song, H. S., Hwang, S. J.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 454-465 (2008).
17. Vollenbroek, J., Hebbink, G. A., Ziffels, S., Steckel, H.: *Int. J. Pharm.* 395, 62-70 (2010).
18. DiNuzio J. C., Brough C., Hughey J. R., Miller, D. A., Williams III, R. O., McGinty, J. W.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 74, 340-351 (2010).
19. Chieng, N., Rades, T., Saville, D.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68, 771-780 (2008).
20. Szakonyi, G., Zelkó, R.: *Acta Pharm. Hung.* 80, 121-127 (2010).
21. Maas, S. G., Schaldach, G., Littringer, E. M., Mescher, A., Griesser, U.J., Braun, D. E., Walzel, P. E., Urbanetz, N. A.: *Powder Technol.* 213, 1-3, 27-35 (2011).
22. Jójárt-Laczkovich, O., Szabó-Révész, P.: *J. Therm. Anal. Calorim.* 102, 243-247 (2010).
23. Szabóné-Révész P., Laczkovich O., Erős I.: *Acta Pharm. Hung.* 74, 39-44 (2004).
24. Jójártné Laczkovich O., Szabóné Révész P.: *Magy. Kém. Foly.* 116, 101-104 (2010).
25. Mártha Cs., Jójártné Laczkovich O., Szabóné Révész P.: *Acta Pharm. Hung.* 81, 37-42 (2011).
26. Mártha, Cs., Kürti, L., Farkas, G., Jójárt-Laczkovich, O., Szalontai, B. Glässer, E., Deli, M. A., Szabó-Révész, P.: *Eur. Polym. J.* 49, 2426-2432 (2013).
27. <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html> [2013.12.02] ICH Q1A(R2) International Conference on Harmonization Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products (2003).

Érkezett: 2014. március 7.
